

TĂNG TRƯỞNG *IN VITRO* CÂY BẠCH HOA XÀ THIẾT THẢO (*Hedyotis diffusa* Willd.)

Đinh Kiều Khanh, Lê Anh Tuấn*, Phan Ngô Hoang

Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

Email*: latuan@hcmus.edu.vn

Ngày gửi bài: 02.08.2017

Ngày chấp nhận: 11.09.2017

TÓM TẮT

Bạch hoa xà thiết thảo (*Hedyotis diffusa* Willd.) là thành phần chính trong các bài thuốc y học cổ truyền nhằm điều trị viêm loét dạ dày, viêm gan và ung thư. Các hợp chất flavonoid, terpenoid với hàm lượng cao trong cây Bạch hoa xà thiết thảo có khả năng kháng viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa và bảo vệ tế bào thần kinh. Trong nghiên cứu này, số lượng chồi phát sinh nhiều nhất trên môi trường MS1/2 (Murashige & Skoog 1962 với đa lượng giảm 50%) bổ sung BA 1 mg/l và IAA 0,1 mg/l. Chồi mới phát sinh thông qua mô sẹo có nguồn gốc từ sự phân chia các tế bào nhu mô biểu bì và nhu mô dưới biểu bì lá. Trong các điều kiện môi trường nuôi cấy khác nhau (tăng cường độ chiếu sáng đến 7.500 lux, tăng lượng sacarose 40 g/l hay bổ sung PEG 3%), môi trường bổ sung PEG 3% có số lượng chồi mới đạt giá trị cao nhất. Tuy nhiên, cụm chồi tăng trưởng mạnh dưới ánh sáng 7500 lux, hàm lượng flavonoid và hoạt tính triterpene đều cao và tương đương với dịch chiết từ các cây trong tự nhiên. Vai trò hormon tăng trưởng nội sinh được phân tích và thảo luận để làm rõ một số thay đổi sinh lý trong quá trình tái sinh chồi cũng như trong quá trình đáp ứng của chồi với các điều kiện nuôi cấy khác nhau.

Từ khóa: Bạch hoa xà thiết thảo, flavonoid, PEG, tái sinh chồi, triterpene.

Growth of *Hedyotis Diffusa* in Vitro Culture

ABSTRACT

Hedyotis diffusa has been used in combination with other herbs in traditional medicine for gastritis, hepatitis and cancer treatment. Flavonoids, anthraquinones, terpenoid with high contents in *Hedyotis diffusa* were reported having anti-inflammatory, antibacterial, antioxidant and neuroprotective. In the present study, 1/2MS medium supplemented with 1mg/l BA and 0.1mg/l IAA is the best condition which gives the highest number of shoot formation. This shoots come from the callus or nodules derived from epithelial tissue or tissue below the epidermis of leaf. In different culture conditions (increase light intensity, increase sucrose concentration, 3% PEG supplement), medium were supplemented with 3% PEG showed the highest number of shoots. However, shoots grew up strongly under 7500 lux light intensity, especially in this condition culture the concentration of flavonoid and activated triterpene are highest, and equivalent with extracts from natural plants. The role of endogenous hormones were analyzed and discussed to understand physiological changes in the shoot formation and response of shoots with different culture conditions.

Keywords: flavonoid, *Hedyotis diffusa*, polyethylene glycol, shoot regeneration, triterpene.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch hoa xà thiết thảo là loài thảo được được sử dụng trong điều trị ung thư (Chen *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2010), bảo vệ tế bào thần kinh (Kim *et al.*, 2001). Các hợp chất thứ cấp trong cây như flavon, anthraquinone,

polysaccharide có hoạt tính kháng sự tăng trưởng của vi sinh vật cao (Shao *et al.*, 2011; Đỗ Tất Lợi, 2004). Hiện nay, các công bố về loài cây này đang tập trung cách thức tách chiết các hợp chất biến dưỡng thứ cấp và khảo sát tác động được lý của chúng, chưa có nhiều công bố liên quan đến nuôi cấy *in vitro* nhằm theo dõi các

thay đổi sinh lý học hướng đến mục tiêu gia tăng các hợp chất flavonoid và triterpene ở thực vật này. Trong nghiên cứu này chúng tôi theo dõi sự phát sinh chồi từ việc nuôi cấy mô lá, đồng thời tìm hiểu một số điều kiện môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự sản xuất và tích lũy flavonoid hay triterpen ở cây Bạch hoa xà thiệt thảo, nhằm mục tiêu cải tiến phương thức trồng và tạo nguồn nguyên liệu sạch cho công nghệ được liệu trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Cây Bạch hoa xà thiệt thảo (*Hedyotis diffusa*) *in vitro* 3 tuần tuổi tăng trưởng trên môi trường MS với đa lượng giảm 50% (MS1/2), sacarose 30 g/l, agar 6 g/l. Điều kiện nuôi cấy $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 2500 ± 500 lux (12/12) và độ ẩm $65 \pm 5\%$, tại Phòng thí nghiệm Sinh lý thực vật, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phát sinh chồi từ mô lá trên môi trường có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: Lá của cây *in vitro* 3 tuần tuổi được tạo vết thương bằng cách cắt vuông góc với gân lá và đặt cấy trên các môi trường: MS1/2 (đối chứng), MS1/2 có bổ sung BA 0,1 mg/l kết hợp với NAA 0,1 mg/l hoặc IAA có nồng độ thay đổi 0,1 hay 0,2 mg/l. Theo dõi sự phát sinh chồi, ghi nhận số chồi hình thành ở mỗi nghiệm thức theo thời gian.

Khảo sát ảnh hưởng một số yếu tố lên sự tăng trưởng chồi cây Bạch hoa xà thiệt thảo in vitro: Khúc cắt thân 5mm mang chồi nách từ cây *in vitro* 3 tuần tuổi tăng trưởng trên môi trường MS1/2 được cô lập và đặt cấy trên các môi trường MS1/2 (đối chứng), MS1/2 có bổ sung hỗn hợp BA 0,1 mg/l, IAA 0,1 mg/l và thay đổi các điều kiện nuôi cấy: ánh sáng 7.500 ± 500 lux; bổ sung sacarose 40 g/l hay 3% PEG 6.000 vào môi trường nuôi cấy. Theo dõi những biến đổi hình thái, ghi nhận số chồi hình thành, khối lượng tươi, khối lượng khô, hàm lượng flavonoid

và hoạt tính triterpene của mẫu cấy sau 3 tuần nuôi cấy.

Phân tích hình thái giải phẫu: Cấu trúc lá, nguồn gốc chồi phát sinh được phân tích sau sự giải phẫu ngang qua gân lá, nhuộm 2 màu đỏ (carmin) - xanh (iode) và quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh: Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật IAA, zeatin, GA_3 và ABA của các cụm chồi phát sinh từ sự nuôi cấy được ly trích và cô lập trên bản mỏng sắc ký silica gel F₂₅₄ (1.0554, Merck) với hệ dung môi di chuyển isopropanol : ammonium hydroxide : H_2O (10 : 1 : 1) ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được xác định bằng sinh trắc nghiệm (Yokota *et al.*, 1980).

Xác định hàm lượng flavonoid và triterpene: Các mẫu cấy *in vitro* và mẫu thu từ những cây trồng trong tự nhiên được làm khô bằng cách sấy mẫu ở nhiệt độ 60°C cho đến khi khối lượng không thay đổi. Lượng flavonoid và triterpene được ly trích theo phương pháp của Verslues *et al.* (2006), hàm lượng flavonoid tương đương được xác định thông qua đường chuẩn rutin; hoạt tính triterpene được xác định nhờ chỉ số OD ở 530 nm (Pandey *et al.*, 2013).

Xử lý số liệu: Số liệu ghi nhận từ các thí nghiệm được xử lý thống kê nhờ chương trình SPSS 11.5. Sự phân hạng, chia nhóm theo công thức Duncan, Dunnett dựa trên những khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$, các giá trị khác biệt được biểu diễn bằng các chữ cái khác nhau kèm theo sau số trung bình.

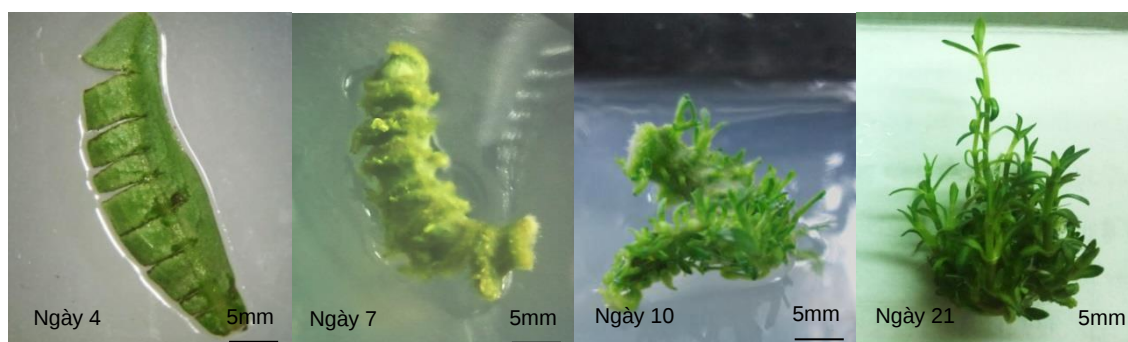
3. KẾT QUẢ

3.1. Phát sinh chồi từ mô lá trên môi trường có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật

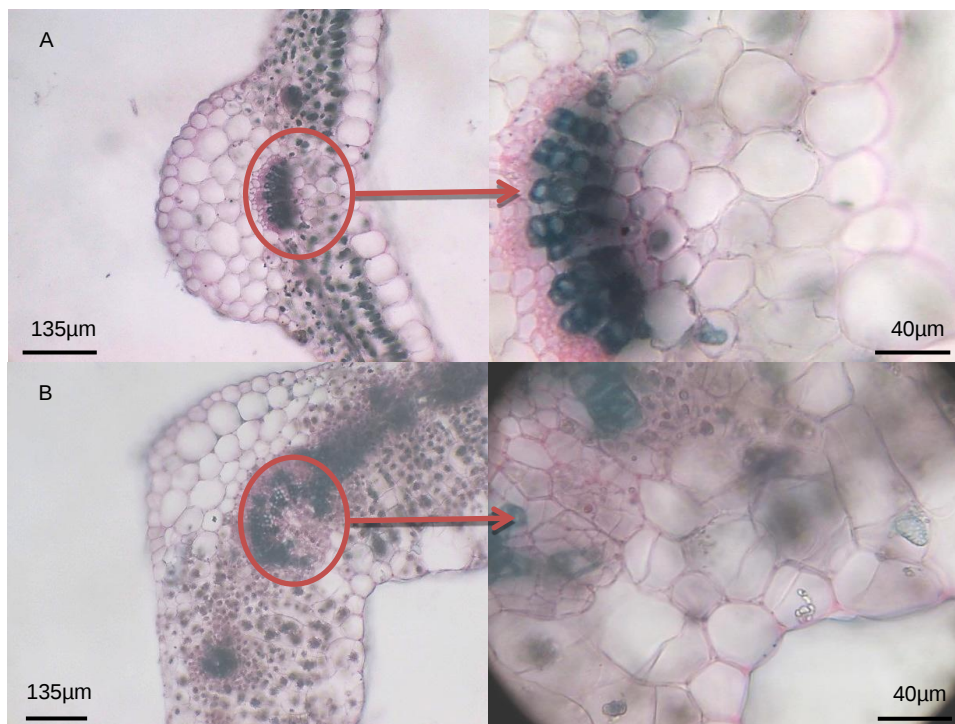
Các lá được tạo vết thương có sự cảm ứng tạo mô sẹo trên cả hai nhóm môi trường MS1/2 có bổ sung BA kết hợp IAA hoặc NAA, lá phù lên và bắt đầu cong lại sau 4 ngày nuôi cấy; trong khi đó không ghi nhận được sự đáp ứng của mô lá trên môi trường đối chứng MS1/2. Sau

7 ngày, mảnh lá trên các môi trường có bổ sung hỗn hợp BA kết hợp IAA xuất hiện nhiều nốt nhỏ, các chồi có thể quan sát rõ ràng sau 10 ngày nuôi cấy (Hình 1). Trong khi đó, trên môi trường có bổ sung BA kết hợp NAA các nốt nhỏ xuất hiện sau 14 ngày nuôi cấy. Khi so sánh với môi trường đối chứng MS1/2, mặc dù có sự xuất hiện rễ từ những vết cắt trên mô lá nhưng không có sự phát sinh chồi từ mô lá sau 14 ngày nuôi cấy.

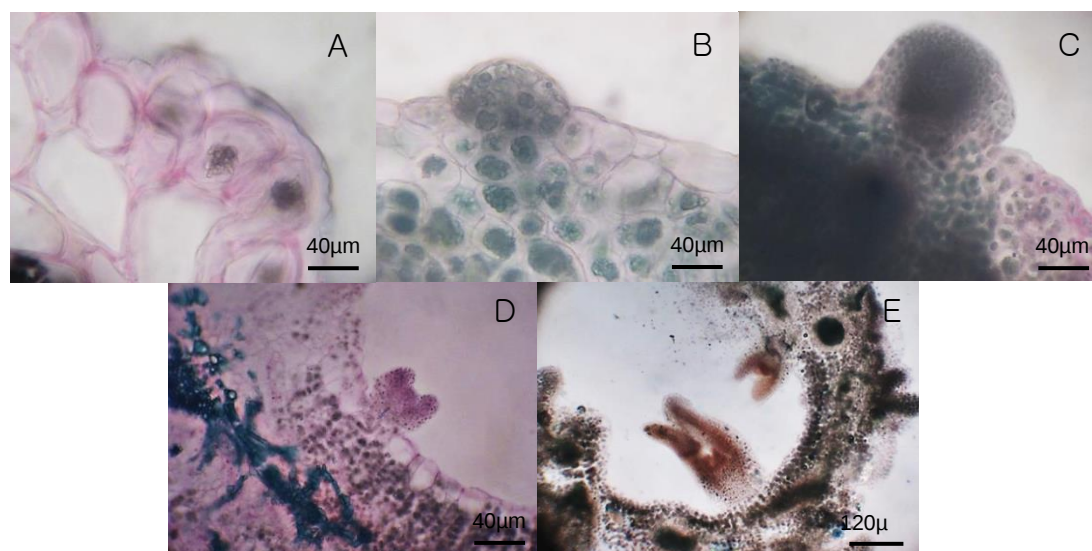
So với các mẫu cấy trên môi trường có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật sau 4 ngày, dưới kính hiển vi, các lát cắt ngang qua mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo *in vitro* trước khi nuôi cấy cho thấy nhóm tế bào nhu mô dưới biểu bì, hệ thống mô mạch tăng trưởng bình thường (Hình 2A). Ngược lại, dưới tác động của BA và IAA trên môi trường nuôi cấy, vùng nhu mô xung quanh mô mạch và nhu mô dưới biểu bì phân chia mạnh để hình thành mô sẹo (Hình 2B).



Hình 1. Phát sinh chồi từ mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo trên môi trường MS1/2 có bổ sung BA 1 mg/l và IAA 0,1 mg/l theo thời gian



Hình 2. Cấu trúc mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo trước (A) và sau 4 ngày (B) trên môi trường MS1/2 có bổ sung BA 1 mg/l và IAA 0,1 mg/l



Hình 3. Biến đổi hình thái tế bào trong quá trình phát sinh chồi từ mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo trên môi trường MS1/2 có bổ sung BA 1 mg/l và IAA 0,1 mg/l theo thời gian: 5 ngày (A), 6 ngày (B), 7 ngày (C), 8 ngày (D), 10 ngày (E)

Bảng 1. Sự phát sinh chồi từ mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo trên môi trường có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, sau 3 tuần

Nghiệm thức	Số chồi	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
MS1/2	0,00 ± 0,00 ^c	0,03 ± 0,00 ^d	0,02 ± 0,000 ^c
MS1/2 có BA 1 mg/l và IAA 0,1 mg/l	82,40 ± 7,06 ^a	2,32 ± 0,12 ^a	0,17 ± 0,01 ^a
MS1/2 có BA 1 mg/l và IAA 0,2 mg/l	71,30 ± 2,34 ^a	1,78 ± 0,11 ^b	0,16 ± 0,17 ^a
MS1/2 có BA 1 mg/l và NAA 0,1 mg/l	19,30 ± 1,90 ^b	0,67 ± 0,11 ^c	0,08 ± 0,01 ^b

Ghi chú: Các số trung bình trong các cột với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$

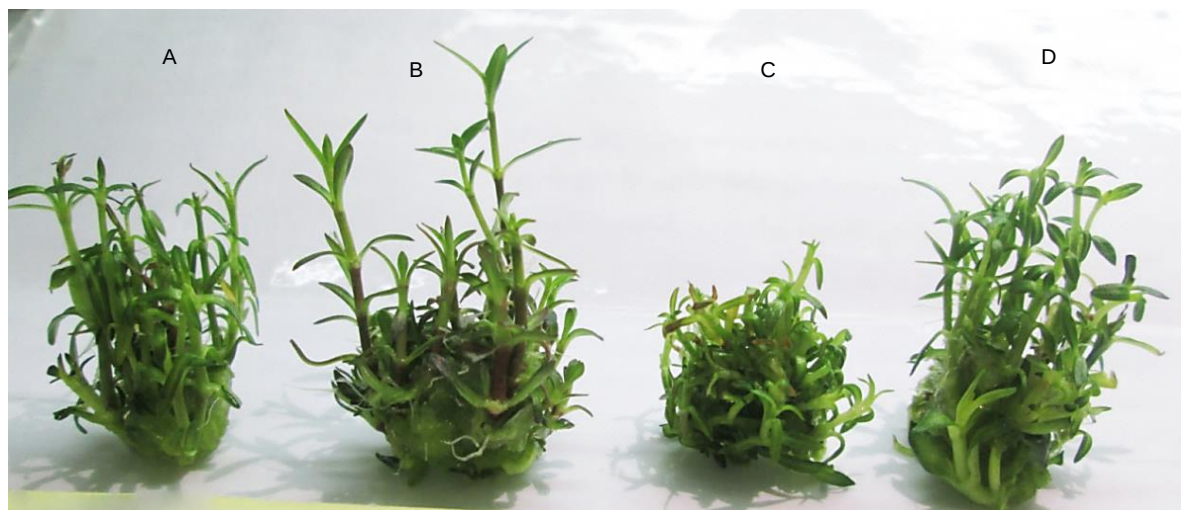
Sau 5 - 6 ngày, tế bào biểu bì và nhu mô dưới biểu bì phân chia hình thành mô sẹo và tạo các nốt nhỏ trên bề mặt mô lá, các nốt này tiếp tục phân hóa hình thành mô phân sinh ngọn chồi với các phác thể lá vào ngày thứ 7; chồi xuất hiện đầy đủ các bộ phận và số lượng cũng gia tăng vào thời điểm ngày thứ 10 sau đó (Hình 3).

Số chồi phát sinh từ mô lá đều đạt giá trị rất cao trên môi trường MS1/2 có bổ sung hỗn hợp BA và IAA. Khối lượng khô của cụm chồi trên các môi trường MS1/2 có bổ sung BA 1 mg/l kết hợp IAA 0,1 hoặc 0,2 mg/l đều cao hơn hẳn so với môi trường có BA 1 mg/l và NAA 0,1 mg/l. Khối lượng tươi của cụm chồi trên môi trường MS1/2 có bổ sung BA 1 mg/l và IAA 0,1 mg/l cao nhất so với các môi trường còn lại (Bảng 1). Do vậy, chúng tôi đã chọn môi trường MS1/2 bổ

sung BA 1mg/l và IAA 0,1 mg/l để tiếp tục các thí nghiệm về sau.

3.2. Ảnh hưởng một số yếu tố lên sự tăng trưởng chồi cây Bạch hoa xà thiệt thảo *in vitro*

Sau 3 tuần, các mẫu cấy trên môi trường bổ sung BA 1 mg/l và IAA 0,1 mg/l trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau có sự biểu hiện khác biệt về hình thái của cụm chồi: dưới ánh sáng 7.500 lux chồi tăng trưởng mạnh, lông thân dài, đặc biệt lá và thân cây tạo thêm sắc tố đỏ, sau 2 tuần nuôi cấy xuất hiện rễ nhưng ít hơn so với các môi trường còn lại (Hình 4B); mẫu cấy trên môi trường có PEG 3%, chồi tạo mới xuất hiện sớm nhất ở ngày thứ 9, tuy nhiên chiều cao chồi thấp nhất, lá nhỏ và nhọn ở đầu, cây ra nhiều rễ



Hình 4. Cụm chồi cây Bạch hoa xà thiết thảo trên môi trường MS1/2 bổ sung BA 1mg/l và IAA 0,1mg/l (A), dưới ánh sáng 7500 lux (B), bổ sung PEG 3% (C), sacarose 40g/l (D) sau 3 tuần

Bảng 2. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường lên sự tăng trưởng *in vitro* cây Bạch hoa xà thiết thảo sau 3 tuần

Nghiệm thức	Số chồi	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
MS1/2	$1,22 \pm 0,10^c$	$0,20 \pm 0,06^b$	$0,02 \pm 0,01^d$
MS1/2 có BA 1 + IAA 0,1 mg/l	$31,67 \pm 3,38^{ab}$	$0,86 \pm 0,08^a$	$0,09 \pm 0,06^{bc}$
MS1/2 có BA 1 và IAA 0,1 mg/l (7.500 lux)	$28,83 \pm 2,64^b$	$0,84 \pm 0,07^a$	$0,10 \pm 0,01^a$
MS1/2 có BA 1 và IAA 0,1 mg/l và PEG 3%	$36,83 \pm 2,05^a$	$0,68 \pm 0,03^a$	$0,08 \pm 0,00^{bc}$
MS1/2 có BA 1, IAA 0,1 mg/l và sac 40 g/l	$25,89 \pm 2,73^b$	$0,67 \pm 0,05^a$	$0,07 \pm 0,01^b$

Ghi chú: Các số trung bình trong các cột với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$

(Hình 4C); trên môi trường có sacarose 40 g/l hay môi trường đối chứng chồi phát triển mạnh, xuất hiện nhiều rễ và có biểu hiện vàng lá trên cụm chồi từ sau 3 tuần nuôi cấy (Hình 4).

Nhìn chung, trên tất cả các nghiệm thức có bổ sung BA 1mg/l và IAA 0,1mg/l ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau đều có những biểu hiện đáp ứng: gia tăng số lượng chồi, gia tăng khối lượng tươi, khối lượng khô so với đối chứng. Trong đó, số lượng chồi đạt giá cao ở nghiệm thức có bổ sung PEG 3%. Khối lượng tươi của mẫu cấy đều cao hơn so với đối chứng nhưng không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Khối lượng khô đạt cao nhất tại nghiệm thức ánh sáng 7500 lux (Bảng 2).

3.3. Biến đổi hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của các mẫu cấy

Hoạt tính IAA trong cụm chồi tăng trưởng dưới ánh sáng 7.500 lux hay bổ sung PEG 3% hay sacarose 40 g/l đều tăng cao so với đối chứng và cao nhất là cụm chồi trên môi trường bổ sung PEG 3%. Zeatin thấp đối với các mẫu cấy tăng trưởng dưới ánh sáng 7.500 lux, nhưng lại cao trên môi trường có bổ sung PEG 3%. Hoạt tính ABA cũng cao nhất trên môi trường có bổ sung PEG 3% và tăng trên môi trường có nồng độ sacarose 40 g/l so với đối chứng. Trong khi đó, hoạt tính GA_3 tăng ở cả ba nghiệm thức, tăng mạnh nhất ở các mẫu cấy dưới ánh sáng 7.500 lux.

Bảng 3. Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh của cụm chồi tăng trưởng trên các điều kiện nuôi cấy khác nhau, sau 3 tuần

Nghiệm thức	Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật ($\mu\text{g/l}$)			
	IAA	Zeatin	ABA	GA ₃
MS1/2	$1,31 \pm 0,03^d$	$0,22 \pm 0,01^c$	$0,26 \pm 0,01^c$	$0,3 \pm 0,02^c$
MS1/2 có BA 1 và IAA 0,1	$1,41 \pm 0,03^d$	$0,29 \pm 0,00^b$	$0,57 \pm 0,04^b$	$0,35 \pm 0,03^c$
MS1/2 có BA 1 và IAA 0,1 mg/l (7.500 lux)	$1,77 \pm 0,03^c$	$0,15 \pm 0,01^d$	$0,28 \pm 0,03^c$	$0,65 \pm 0,02^a$
MS1/2 có BA 1, IAA 0,1 mg/l và PEG 3%	$2,35 \pm 0,03^a$	$0,53 \pm 0,01^a$	$0,77 \pm 0,04^a$	$0,46 \pm 0,01^b$
MS1/2 có BA 1, IAA 0,1 mg/l và sac 40 g/l	$1,98 \pm 0,09^b$	$0,30 \pm 0,01^b$	$0,62 \pm 0,00^b$	$0,51 \pm 0,00^b$

Ghi chú: Các số trung bình trong các cột với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$

3.4. Hàm lượng flavonoid và hoạt tính triterpene từ dịch trích cụm chồi cây Bạch hoa xà thiệt thảo *in vitro*

Hàm lượng flavonoid hiện diện trong cụm chồi cây Bạch hoa xà thiệt thảo tăng trưởng dưới ánh sáng 7500 lux cao tương đương với

mẫu lấy từ các cây trồng trong tự nhiên.

Hàm lượng triterpen (xác định thông qua chỉ số OD ở 530 nm) của cụm chồi tăng trưởng trên các điều kiện môi trường ánh sáng 7.500 lux, môi trường có bổ sung PEG 3%, đường 40 g/l đều giảm so với đối chứng và mẫu cây từ tự nhiên.

Bảng 4. Hàm lượng Flavonoid của cụm chồi tăng trưởng trên các điều kiện môi trường khác nhau so với mẫu cây được thu hái trong tự nhiên

Nghiệm thức	Hàm lượng Flavonoid (mg/g chất khô)
Cây trong tự nhiên	$20,57 \pm 1,26^a$
MS1/2	$15,07 \pm 0,41^{bc}$
MS1/2 có BA 1 và IAA 0,1 mg/l	$18,19 \pm 0,85^{ab}$
MS1/2 có BA 1 và IAA 0,1 mg/l (7.500 lux)	$20,80 \pm 2,50^a$
MS1/2 có BA 1, IAA 0,1 mg/l và PEG 3%	$14,06 \pm 0,31^c$
MS1/2 có BA 1, IAA 0,1 mg/l và sac 40 g/l	$14,78 \pm 0,56^c$

Ghi chú: Các số trung bình trong các cột với các chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$.

Bảng 5. Hoạt tính triterpen của cụm chồi tăng trưởng trên các điều kiện môi trường khác nhau so với mẫu cây được thu hái trong tự nhiên

Nghiệm thức	Hoạt tính triterpen
Cây trong tự nhiên	$0,11 \pm 0,00^{ab}$
MS1/2	$0,12 \pm 0,01^a$
MS1/2 có BA 1 và IAA 0,1 mg/l	$0,12 \pm 0,05^a$
MS1/2 có BA 1 và IAA 0,1 mg/l (7.500 lux)	$0,09 \pm 0,09^{ab}$
MS1/2 có BA 1, IAA 0,1 mg/l và PEG 3%	$0,05 \pm 0,00^b$
MS1/2 có BA 1, IAA 0,1 mg/l và sac 40 g/l	$0,05 \pm 0,00^b$

Ghi chú: Các số trung bình trong các cột với các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$

4. THẢO LUẬN

Sự phát sinh chồi mới từ mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo được cảm ứng từ các tế bào mô sẹo có nguồn gốc từ tế bào nhu mô dưới biểu bì và biểu bì lá trong điều kiện nuôi cấy thích hợp. Dưới sự tác động kết hợp BA và IAA ngoại sinh trong môi trường nuôi cấy, tế bào nhu mô biểu bì và dưới biểu bì có sự phân chia mạnh ở ngày thứ 4 (Hình 2B). Sự đáp ứng của mô lá với môi trường nuôi cấy diễn ra mạnh, đặc biệt là ở các vùng vết thương và bề mặt lá nơi tiếp xúc với môi trường có chứa chất dinh dưỡng, khoáng, chất điều hòa tăng trưởng thực vật. Các tế bào tiếp tục phân chia hình thành mô sẹo hay các nốt trên bề mặt lá theo thời gian nuôi cấy để hình thành chồi (Hình 3). Số lượng chồi phát sinh từ mô lá trong quá trình đạt được rất cao trên môi trường có bổ sung BA 1 mg/l kết hợp IAA 0,1mg/l hay IAA 0,2 mg/l, khoảng 76 - 89 chồi/lá. Hiệu ứng tác động của auxin khi phối hợp cytokinin ở đây phụ thuộc vào loại, nồng độ và thời gian tác động (Bảng 1). Kết quả này cũng tương tự như sự phát sinh chồi *in vitro* từ mô lá cây cúc Hà Lan (Trần Thanh Hương và cs., 2013).

Sau 4 tuần nuôi cấy, dưới ánh sáng 7.500 lux hàm lượng IAA nội sinh của cụm chồi tăng đi cùng với hiện tượng xuất hiện rễ nhưng số lượng không nhiều. Trong khi đó, hàm lượng zeatin nội sinh lại giảm mạnh so với môi trường bổ sung BA 1 mg/l kết hợp IAA 0,1 mg/l đã dẫn đến giảm số lượng chồi trên mẫu cấy. Ngoài ra, các chồi ở nghiệm thức này có chiều cao vượt hơn các mẫu cấy ở các điều kiện môi trường khác do hàm lượng GA₃ nội sinh trong mẫu cấy tăng cao. Dưới ánh sáng 7.500 lux, số lượng chồi giảm và các chồi xuất hiện thêm sắc tố đỏ trên lá và thân có thể giải thích do dưới tác động của môi trường khắc nghiệt ánh sáng cao này cây Bạch hoa xà thiệt thảo gia tăng tổng hợp các sắc tố bảo vệ để kháng lại yếu tố bất lợi.

Việc bổ sung PEG 3% vào môi trường nuôi cấy nhằm tạo môi trường nuôi cấy khô hạn và duy trì sự khô hạn ở mức ổn định. Dưới điều kiện này, cụm chồi cây Bạch hoa xà thiệt thảo đáp ứng bằng cách phát sinh nhiều rễ hay kết

thúc chu trình phát triển, kết quả này cũng được thấy rõ trong nghiên cứu tương tự do Huỳnh Thị Diễm Phúc và cs. (2011) trên cây Dền xanh (*Amaranthus viridis* L.). Cả hai nghiên cứu đều cho thấy dưới tác động của điều kiện khô hạn do PEG gây ra, hàm lượng ABA, IAA và Zea nội sinh tăng cao dẫn đến sự hình thành rễ và cũng có sự gia tăng cao nhất về số lượng chồi. Sự gia tăng ABA nội sinh là một trong những hormone báo hiệu sự khô hạn cũng như khi thực vật gặp hạn sinh lý. Hơn nữa, những biểu hiện của sự thích ứng với điều kiện môi trường khắc nghiệt này, diện tích lá của các chồi giảm và ABA nội sinh cao giúp đóng khí khổng để tránh sự mất nước của cây vào môi trường xung quanh là hợp lý với quan điểm về sự thích nghi của thực vật.

Khi bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy nhằm cung cấp nguồn carbon cho các mô có khả năng quang tự dưỡng thấp tuy nhiên tương tự như bổ sung PEG 3%, môi trường có sacarose 40 g/l ít nhiều cũng dẫn đến hiện tượng gia tăng áp suất thẩm thấu, giảm hô hấp và giảm tích lũy flavonoid và triterpen trong mẫu cấy so với đối chứng. Áp suất thẩm thấu cao tác động đến quá trình trao đổi chất của tế bào, suy giảm hoạt động của chuỗi chuyển điện thế trên màng tế bào, suy yếu quá trình hô hấp tế bào và đưa đến tình trạng ức chế sự tăng trưởng cũng như giảm khả năng tổng hợp các hợp chất thứ cấp, tuy vậy các tác giả cũng cho thấy cơ chế tác động vẫn chưa được làm rõ (Kim *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2010; Bùi Trang Việt, 2016).

Các điều kiện môi trường nuôi cấy khác nhau đã tác động đến quá trình tổng hợp các hợp chất biến dưỡng thứ cấp trong cây Bạch hoa xà thiệt thảo. Theo Gershenzon *et al.* (2000), flavonoid và nhóm triterpene có khả năng kháng oxi hóa, kháng lại sự tăng trưởng của vi khuẩn hay nấm, bảo vệ thực vật tránh động vật ăn cỏ và sự xâm lấn của các loại thực vật khác, cũng như khả năng bảo vệ thực vật trước tia UV. Ánh sáng với cường độ cao thích hợp kích thích sự tổng hợp các hợp chất thứ cấp, đặc biệt là flavonoid (Russell & Galston, 1969; Petrussa *et al.*, 2013). Trong nghiên cứu này, dưới ánh

sáng 7500 lux hàm lượng flavonoid trong chồi cây Bạch hoa xà thiệt thảo tăng cao nhằm bảo vệ cây trước tác động của sự dư thừa năng lượng khi quang hợp quá mức, ghi nhận này cũng phù hợp với lý thuyết đặc tính kháng điều kiện bất lợi của thực vật (Bùi Trang Việt, 2016).

5. KẾT LUẬN

Chồi phát sinh từ mô lá cây Bạch hoa xà thiệt thảo đạt số chồi cao trên môi trường MS1/2 bổ sung BA 1 mg/l kết hợp IAA 0,1 mg/l với 76 - 89 chồi/lá, khối lượng tươi và khối lượng khô tăng cao sau 4 tuần. Chồi mới phát sinh gián tiếp thông qua mô sẹo có nguồn gốc từ các tế bào biểu bì và nhu mô dưới biểu bì lá. Trên môi trường MS1/2 có BA 1 mg/l kết hợp IAA 0,1 mg/l có bổ sung PEG 3% số lượng chồi mới và rễ nhiều, tuy nhiên chồi kém phát triển với lá nhỏ và chiều cao chồi thấp. Trên môi trường bổ sung sacarose 40 g/l có hiện tượng vàng lá sớm ở tuần thứ 3; dưới ánh sáng 7.500 lux, chồi xuất hiện nhiều sắc tố đỏ, chồi cao, hàm lượng flavonoid ở nghiệm thức này cũng đạt giá trị cao nhất (20,8 mg/g chất khô), tương đương với cây được thu hái trong tự nhiên.

Với kết quả ban đầu này, chúng tôi sẽ tiếp tục khảo sát chất lượng tia sáng, đặc biệt tác động của ánh sáng đơn sắc trong quá trình tăng trưởng và sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp thuộc nhóm phenolic nhằm có thể xác lập một kỹ thuật trồng trọt mới trong tương lai với mục đích khai thác nguồn dược liệu.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn Lương y Nguyễn Đức Nghĩa đã giới thiệu và hỗ trợ vật liệu nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chen X.Z., Cao Z.Y., Chen T.S., Zhang Y.Q., Liu Z.Z., Su Y.T. and Du J. (2012). Water extract of *Hedyotis diffusa* Willd. suppresses proliferation of human HepG2 cells and potentiates the anticancer efficacy of low-dose 5-fluorouracil by inhibiting

the CDK2 E2F1 pathway. *Oncology reports*, 28(2): 742-748.

Cui X.H., Murthy H.N., Wu C.H. and Paek K.Y. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 103(1): 7-14.

Gershenzon J., McConkey M.E. and Croteau R.B. (2000). Regulation of monoterpenes accumulation in leaves of Peppermint, *Plant Physiology*, 122: 205-213.

Trần Thanh Hương, Ngô Phước Hạnh và Phan Ngô Hoàng (2013). Biến đổi hình thái và sinh lý trong quá trình phát sinh chồi từ mảnh lá cây cúc Hà Lan nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*, 11(4): 466-472.

Đỗ Tất Lợi (2004). *Cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr. 250-251.

Kim Y., Park E.J., Kim J., Kim Y.B., Kim S.R. and Kim Y.C. (2001). Neuroprotective constituents from *Hedyotis diffusa*. *Journal of natural products*, 64(1): 75-78.

Lin J., Chen Y., Wei L., Chen X., Xu W., Hong Z. and Peng J. (2010). *Hedyotis diffusa* Willd. Extract induces apoptosis via activation of the mitochondrion-dependent pathway in human colon carcinoma cells. *International journal of oncology*, 37(5): 1331.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.

Pandey D., Malik T. and Banik R.M. (2013). Validated HPTLC-Method for quantification of variability in content of oleanolic acid in different variety of *Lantana camara*. *Pharmacologia*, pp. 126-131.

Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S. and Vianello A. (2013). Plant flavonoids biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International journal of molecular sciences*, 14(7): 14950-14973.

Huỳnh Thị Diễm Phúc, Trịnh Cẩm Tú và Phan Ngô Hoàng (2011). Sự ra hoa *in vitro* cây Dền xanh (*Amaranthus viridis* L.) trong điều kiện khô hạn do PEG. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh*, 14(3): 38-45.

Russell D.W. and Galston A.W. (1969). Blockage by gibberellic acid of phytochrome effects on growth, auxin responses, and flavonoid synthesis in etiolated pea internodes. *Plant physiology*, 44(9): 1211-1216.

Shao J., Guoqing G. and Louis T. (2011). An Evidence-

- based. Perspective of *Hedyotis diffusa* or *Oldenlandia diffusa* (*Spreading hedyotis*) for cancer patients. Evidence-based anticancer materia medica. Springer Netherlands, pp. 179-192.
- Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J. and Zhu J.K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. The Plant Journal, 45(4): 523-539.
- Bùi Trang Việt (2016). Sinh lý thực vật đại cương. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 753 trang.
- Yokota T., Murofushi N. and Takahashi N. (1980). Extraction, purification and identification, hormonal regulation of development, Molecular aspects of plant hormones, edited by J. MacMillan. Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Springer New York, 9: 113-201.